整合素 β 亚基参与调节腰带长体茧蜂多胎增殖过程

颜　曦[1,2]，王　鹏[1]，胡　建[1,*]
（1. 中山大学生命科学学院，中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室，广州 510275；
2. 中国水产科学院珠江水产研究所，广州 510380）

摘要：整合素是由 α 和 β 亚基组成的异源二聚体跨膜蛋白，在调控细胞增殖中起重要作用。本实验初步研究了腰带长体茧蜂 *Macrocentrus cingulum* 整合素 β 亚基在胚胎增殖中所起的作用。用 PCR 方法克隆获得了腰带长体茧蜂整合素 β 基因 *Mcitg-β*（GenBank 登录号为 KC784942），其开放读码框全长 2 526 bp，编码 841 个氨基酸，含有整合素基因特有的多个功能域。*Mcitg-β* 与已报道的昆虫整合素基因具有很高的序列相似性，系统发育分析结果表明其与膜翅目的熊蜂 *Bombus impatiens* 整合素基因核苷酸序列一致性最高，达 76%。定量 PCR 结果表明 *Mcitg-β* 在蜂卵中大量表达，在初级胚胎及二级胚胎细胞中也有表达，但在桑葚胚中没有表达。将 ds*Mcitg-β* 通过体外浸泡法导入到二级胚胎或体内注射法导入到寄主亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 幼虫体内后，可极显著抑制腰带长体茧蜂整合素基因的表达量，降低胚胎增殖能力，并减少出蜂数量。结果初步证明 Mcitg-β 可能对调节多胚发育的腰带长体茧蜂的胚胎增殖起重要的作用。

关键词：腰带长体茧蜂；整合素 β 亚基；基因克隆；RNA 干扰；胚胎增殖
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2013)07-0715-09

Integrin β is involved in regulating embryonic proliferation in the polyembryonic wasp *Macrocentrus cingulum* (Hymenoptera: Braconidae)

YAN Xi[1,2], WANG Peng[1], HU Jian[1,*] (1. State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Integrin are transmembrane heterodimers composed of α and β subunits, playing an important role in regulating cell proliferation. This study investigates how integrin β functions during embryonic proliferation in *Macrocentrus cingulum*. *Mcitg-β* (GenBank accession no. KC784942) was successfully cloned by PCR. It has an open reading frame of 2 526 bp, encodes an 841 amino-residual protein, and contains typical function domains of integrin genes. Alignment results showed that *Mcitg-β* is a member of insect integrin gene family, and phylogenetic analysis showed that it shares the highest nucleotide sequence identity (up to 76%) with the integrin gene from *Bombus impatiens*. qRT-PCR results revealed that *Mcitg-β* was expressed in primary embryos and secondary embryos, especially highly in eggs, but none in morulae. After RNA interference with ds*Mcitg-β* or si*Mcitg-β* in culture medium, the expression of *Mcitg-β* mRNA and proliferation ability of embryos were decreased. Furthermore, injecting ds*Mcitg-β* into the parasitized larvae of host *Ostrinia furncalis* decreased the number of wasp's offsprings in each host larva. These results initially prove that Mcitg-β may play important roles in regulating the proliferation of embryos in *M. cingulum*.

Key words: *Macrocentrus cingulum*; integrin β subunit; gene cloning; RNA interference (RNAi); embryonic proliferation

整合素是一类由 α 和 β 两种亚基通过非共价交联组成的异二聚体跨膜蛋白。作为重要的细胞粘连分子，整合素参与细胞与细胞及细胞与基质之间的相互作用。整合素分子结构非常保守，在多个物

基金项目：中山大学青年教师培育项目；国家重大基础研究计划（“973”计划）项目(2013CB127603)
作者简介：颜曦，女，1987 年 12 月生，广州人，硕士研究生，研究方向为昆虫发育，E-mail：yancyethan@aliyun.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lsshj@mail.sysu.edu.cn
收稿日期 Received: 2013-04-01；接受日期 Accepted: 2013-06-14

种如哺乳动物、昆虫、鱼类和线虫中都有表达。已有研究表明，在人和小鼠的细胞中整合素存在 18 种 α 亚基和 8 种 β 亚基，它们组成 24 种不同的整合素如 α1β1，α2β1 和 αVβ3 等，并行使不同功能（Hynes，2002；Barczyk *et al*.，2010）。

整合素在细胞增殖过程中起重要作用，它主要通过调控细胞周期来调节细胞的增殖和分化。细胞的增殖通常需要细胞同细胞外基质相结合以激活整合素，被激活的整合素随后激活与体内相连的多功能粘附斑激酶，再由它激活其下游分子，从而调控细胞的增殖和分化。假如用缺乏整合素的培养基培养干细胞，则会出现在未充分增殖便过早进入分化阶段的情况（Loeb，2006）。此结果暗示，整合素的缺失将影响细胞正常的增殖与分化能力。此外，整合素还参与昆虫胚胎翅的发育、内脏的形态建成、气管末端分支的维持以及上皮细胞外基质与表皮的连接等，并对昆虫行为的成熟及死亡率有一定影响（Goddeeris *et al*.，2003）。此多样性的功能是由于各条信号通路由不同的整合素调节，在不同的细胞中起作用，从而决定着不同类型细胞或不同环境中细胞的存活、增殖及迁移等（Giancotti and Ruoslahti，1999；Giancotti and Tarone，2003）。此外，整合素还行使诸如调节细胞黏附性等功能，与昆虫的细胞免疫反应有密切联系。从大豆夜蛾 *Pseudoplusia includens*、烟草天蛾 *Manduca sexta* 和亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 中克隆出多个整合素亚基，并发现其在血细胞黏附和包囊外源物时，表达量急剧增加，在调节血细胞的黏附和包囊过程中起到重要作用（Lavine *et al*.，2003；Hu *et al*.，2010；Xu *et al*.，2012）。

腰带长体茧蜂 *Macrocentrus cingulum* 是一种多胚发育的幼虫内寄生蜂，通常一个卵可以分裂、增殖出几百至上千个胚胎，最终发育成几十至上百个个体。多胚发育同其他发育模式最大的区别就是胚胎增殖，正是因为胚胎的大量增殖才产生了多个胚胎，对胚胎增殖的研究将有利于找到多胚发育的机制，但关于多胚寄生蜂胚胎的增殖机制国内外目前还没有任何报道。作为一类重要的细胞黏附分子，整合素在细胞周期、细胞分裂和细胞凋亡中起重要的调控作用，因此本研究对整合素在腰带长体茧蜂胚胎增殖中所起的调控作用进行探索，这不仅有利于多胚发育的研究，也有利于对干细胞的分化和更新以及人类双胞胎的产生机制等问题的研究。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

腰带长体茧蜂 *M. cingulum*（膜翅目：茧蜂科）及其寄主亚洲玉米螟 *O. furnacalis*（鳞翅目：螟蛾科）采自江苏省，自 2007 年一直在实验室进行繁殖。饲养条件为温度（25 ± 1）℃，相对湿度 70% 条件下，光周期 16L∶8D。茧蜂羽化后饲喂 20% 的蜂蜜水。亚洲玉米螟用人工饲料进行饲养（周大荣等，1980）。在进行 RNAi 干扰实验时，在人工气候箱内单头饲养，其他条件不变。

1.2 寄主

以 4 龄末期的亚洲玉米螟幼虫作为腰带长体茧蜂的寄主，按 2∶1 的蜂虫比寄生 4 h 后取出，被寄生的亚洲玉米螟幼虫放入人工饲料中饲养。

1.3 腰带长体茧蜂成熟卵细胞和胚胎的收集

将已交配过的寄生蜂雌蜂冷冻麻醉，75% 乙醇消毒体表后在含抗生素的 1 × Pringle’s 昆虫生理盐水（1 × PS）中进行解剖。利用眼科镊拉出蜂尾，从卵巢管中收集成熟卵细胞，转入 TC-100 培养基中。根据胚胎发育的阶段性特点，可在寄生后第 1 天获得初级胚胎、第 4 天获得二级桑葚胚，以及第 5 天获得二级胚胎。

1.4 腰带长体茧蜂整合素 β 全长基因的克隆

解剖寄主幼虫收集发育第 7 天的胚胎，用生理盐水洗净后在液氮中迅速研磨成粉状，利用柱式高纯总 RNA 快速提取试剂盒（Omega，USA）提取总 RNA。

根据 GenBank 数据库已登录的整合素 β 基因序列的保守区域，设计 2 对简并引物（表 1）。取腰带长体茧蜂总 RNA 1 μg，以 Oligo（dT）$_{18}$为引物反转录合成 cDNA；然后以上述 cDNA 为模板，扩增 β-整合素基因。反应条件：94℃ 3 min；94℃ 45 s，50℃ 45 s，72℃ 1 min，35 个循环；72℃ 10 min。目的片段切胶回收后，送深圳华大基因研究院测序。

根据获得整合素 β 基因片段，采用 RACE 技术进行全长克隆。取腰带长体茧蜂成蜂 30 头，用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒（Invitrogen Co.，USA）提取总 RNA，然后用 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit［宝生物工程（大连）有限公司］合成 5′和 3′-RACE-Ready cDNA。根据克隆获得的整合素 β 基因片段序列，利用 Primer Premier 5.0

软件分别设计特异性上游引物和下游引物（表 1），委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行合成。cDNA 全长克隆采用 25 μL 的 PCR 反应体系，第 1 轮 PCR 反应循环条件为：94℃ 30 s，72℃ 3 min，5 个循环；94℃ 3 s，55℃ 30 s，72℃ 3 min，30 个循环；72℃ 延伸 10 min，12℃ 保存。将第 1 轮 PCR 产物稀释 10 ~ 100 倍作为模板进行相同条件的第 2 轮 PCR。目的片段切胶回收后，送深圳华大基因研究院测序。

1.5　腰带长体茧蜂 β-整合素基因的表达检测

用柱式高纯总 RNA 快速提取试剂盒（Omega，USA）分别提取成熟卵细胞、初级胚胎、二级桑葚胚、二级胚胎的总 RNA，并反转录为 cDNA 第一链，采用 DNAStar 软件设计引物（表 1）。利用 ABI 7500 Real-Time PCR System（Applied Biosystems，Foster City，CA，USA）进行荧光定量 PCR 反应。qRT-PCR 的反应体系为 20 μL。实时荧光定量 PCR 采用两步法标准程序：94℃ 预变性 30 s；95℃ 5 s，55℃ 15 s，72℃ 10 s，95℃ 10 s，共 45 个循环反应后进行熔解曲线分析，以排除非特异性 PCR 产物的污染。用 Roche LightCyler 480 软件（Applied Biosystems，Foster City，CA，USA）进行数据记录和分析。用灭菌超纯水代替 cDNA 模板作为空白对照。设 3 次生物学重复。以 *rps* 作为内参基因进行相对定量。

表 1　本研究使用的主要引物
Table 1　Primers used in this study

引物名称 Primer Name	引物序列（5′－3′） Primer sequence	引物用途 Primer usage
Mcitg-F1	GAYAAYTTYTCBTGYRAWCG	*Mcitg-β*-1 扩增 Amplification of *Mcitg-β*-1
Mcitg-R1	GGATTBTTGAAVGTHGWDGT	
Mcitg-F2	GGYAGYTTYGTBGAYAAAGT	*Mcitg-β*-2 扩增 Amplification of *Mcitg-β*-2
Mcitg-R2	GAWATVSWBGGATAATCYTG	
Mcitg-F3	CACTATGCTGGCGATGGAA	*Mcitg-β*-3 扩增 Amplification of *Mcitg-β*-3
Mcitg-R3	CAAACGCATTCTCCGCACT	
Mcitg-F4	CGCCATCCGATTTCTTTCC	5′-RACE
Mcitg-R4	GCTTCTGTTTGTCGTCCTCC	
Mcitg-F5	CACCTCTGCTCCAACCACG	3′-RACE
Mcitg-R5	GGAACCTGTCAGTGCGGAGAA	
Mcitg -F	GTCAGTGCGGAGAATGCGTTTGT	全长 cDNA 验证 Full-length cDNA cloning
Mcitg -R	CCCGACGGTCGTGTATCGTTGTA	
Mcitg-T7F	GGATCC TAATACGACTCACTATAGGGTCAGTGCGGAGAATGCGTTTGT	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
Mcitg -T7R	GGATCC TAATACGACTCACTATAGGCCCGACGGTCGTGTATCGTTGTA	
GFP-T7F	GGATCG TAATACGACTCACTATAGGAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCG	
GFP-T7R	GGATCG TAATACGACTCACTATAGGCAGCAGGACCATGTGATCGCGC	
Real Mcitg-F	TGACGGATTGAAGGTTGGCACG	qRT-PCR
Real Mcitg-R	ACCCGCAGTCGCACAGCATCTC	
rps-R	GCTCATCGGAGGTCTGGCTGTC	
rps-F	ACGTGGCGAGTTGCAGTGTCG	

带下划线部分为 T7 启动子的序列。The T7 promoter sequence is underlined.

1.6　dsRNA 与 siRNA 合成

以验证测序后的菌株质粒提取液作为模板，采用 300 ~ 400 μL 的体系进行 PCR 扩增，产物回收后选择 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System（Promega，USA）回收试剂盒进一步纯化模板，用 T7 RiboMAX™ Express RNAi System（Promega，

Madison, WI, USA）合成试剂盒合成 dsRNA。siRNA 的合成采用核糖核酸酶Ⅲ（NEB, UK）酶切 dsRNA 的方法。检测浓度后，稀释每管 dsRNA 或 siRNA 浓度至 5 μg/μL。

1.7 胚胎移植

挑选寄生后 5 d 的亚洲玉米螟进行解剖，收集腰带长体茧蜂的二级桑葚胚和二级胚胎。二级桑葚胚需经体外培养胚胎细胞 24 h 后，分裂增殖成多个二级胚胎。解剖所得的二级胚胎则可作直接移植之用。用自制毛细管收集培养基中二级胚胎。向每头未寄生过的亚洲玉米螟注射 1 个二级胚胎，分别注射 30 头/批。重复注射 2 批亚洲玉米螟。将注射后的亚洲玉米螟用玻璃管单头饲养。7 d 后解剖亚洲玉米螟，收集其中的胚胎并观察发育状况。

1.8 RNAi 实验

1.8.1 浸泡法 RNA 干扰：收集腰带长体茧蜂的二级胚胎细胞并体外培养，ds*Mcitg-β* 和 si*Mcitg-β* 以及相应的对照 ds*GFP* 和 si*GFP* 在培养基中的浓度均为 50 μg/mL。培养 15 h 后，收集培养基中的二级胚胎。一部分胚胎细胞利用柱式高纯总 RNA 快速提取试剂盒（Omega, USA）提取 RNA 并制备二级胚胎的 cDNA，qRT-PCR 检测 dsRNA 和 siRNA 处理后整合素 β 基因的表达情况。另一部分胚胎细胞移植至未寄生的亚洲玉米螟幼虫体内。

1.8.2 注射法 RNA 干扰：挑选寄生后 30 h 的玉米螟。实验组每头玉米螟幼虫注射入 4 μL 含 20 μg 的 ds*Mcitg-β*，对照组注射入等体积等量的 ds*GFP*，分别注射 15 头。重复注射 3 批亚洲玉米螟，注射后用玻璃管单头饲养，25 d 后统计每头亚洲玉米螟的出蜂数量。

1.9 数据统计与分析

所有的统计分析均使用 SPSS 13.0 软件完成，且数据均以平均数 ± 标准误（*SE*）表示。qRT-PCR 实验中的 mRNA 相对表达量采用单因素方差分析，并进行 Tukey 氏显著性检验。

2 结果与分析

2.1 腰带长体茧蜂整合素 β 基因的全长克隆及基因功能

在 GenBank 中搜索到与腰带长体茧蜂亲缘关系最近的物种的类似基因，分别为：西方蜜蜂 *Apis mellifera* 整合素基因（GenBank 登录号分别为 328784458 和 380016584）和丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 整合素基因（GenBank 登录号分别为 345485082 和 345487182）。根据保守性区域分别设计 2 对简并引物（表 1）。首先扩增得到靠近 3′端的长 725 bp 的中间片段 *Mcitg-β*-1，和靠近 5′端的 548 bp 的中间片段 *Mcitg-β*-2。将此中间片段与 NCBI 核酸数据库进行比对，与 Integrin β 基因最为相似，且与同属膜翅目的熊蜂 *Bombus impatiens* 整合素基因核苷酸序列一致性最高，达到 76%。因此，可确认两中间片段为腰带长体茧蜂 *Mcitg-β* 基因片段。再根据中间片段设计特异性引物，继而获得 *Mcitg-β*-1 与 *Mcitg-β*-2 之间 941 bp 的中间片段 *Mcitg-β*-3，并通过 RACE 技术扩增获得了 5′末端的序列 *Mcitg-β*-4 和 3′末端序列 *Mcitg-β*-5（图 1）。将末端序列与中间片段序列拼接，获得腰带长体茧蜂 1 个整合素基因全长 cDNA，命名为 *Mcitg-β*（GenBank 登录号为 KC784942）。*Mcitg-β* 全长为 2 727 bp，开放阅读框 2 526 bp，编码 841 个氨基酸（图 2）。为了验证序列的完整性，在得到的全长序列两侧设计特异引物（表 1）扩增全长基因，最终测序得到的全长序列与拼接得到的全长序列完全相同。

利用 SignalP 3.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）进行分析，发现其在 N 末端存在一个由 21 个氨基酸组成的信号肽，因此成熟的 Mcitg-β 蛋白为 820 个氨基酸。用 Compute pI/Mw 工具（http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html）预测其成熟蛋白的分子量约 90.6 kDa，等电点为 5.47。此外，利用 NetOGlyc 3.1（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/）分析发现 Mcitg-β 蛋白含有 9 个潜在的 N 糖基化位点和一段可以进行 O 糖基化的区域。TMHMM v.2.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/）的分析结果表明 Mcitg-β 有一个跨膜区结构，因此，其结构可以分为 3 部分，即胞外区（第 1 ~ 771 位氨基酸）、跨膜区（第 772 ~ 794 位氨基酸）和胞内区（第 795 ~ 841 位氨基酸）。

利用 CDD（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）进行分析，发现 Mcitg-β 主要包含 3 个大的保守结构域：整合素 β 结构域（第 42 ~ 498 位氨基酸）、整合素 β tail 结构域（第 685 ~ 771 位氨基酸）和胞内的整合素 β 胞质结构域（第 795 ~ 841 位氨基酸）（图 2）。整合素 β 结构域靠近外胞区的 N 端，主要负责直接调节细胞与细胞及细胞与基质间的粘连。此处的I-like结构域是重要

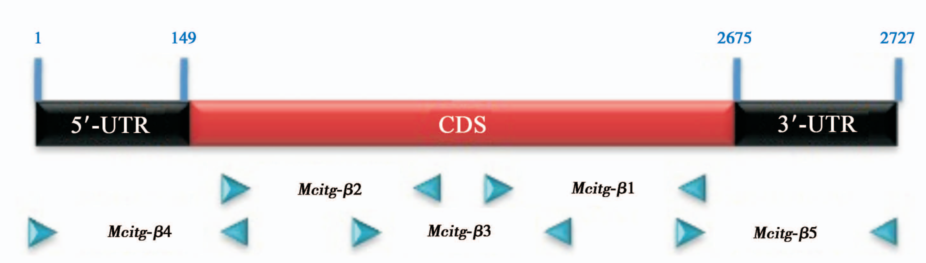


图 1　腰带长体茧蜂 *Mcitg-β* 的全长克隆策略

Fig. 1　Complete sequence cloning strategy of an integrin β subunit gene from *Macroentrus cingulum* (*Mcitg-β*)

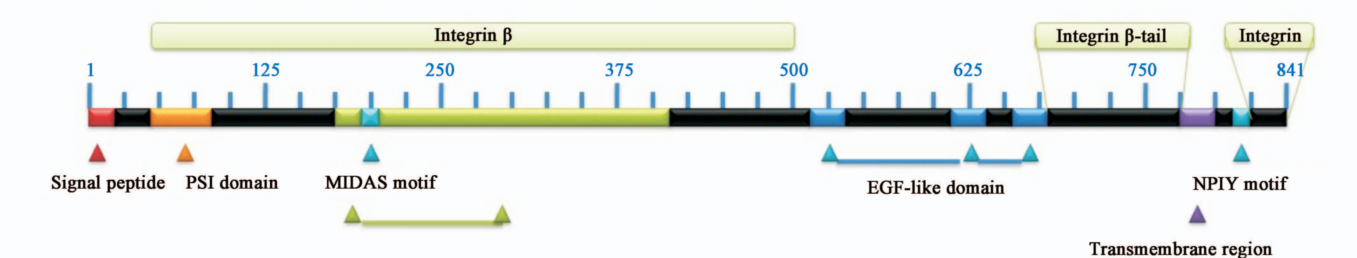


图 2　腰带长体茧蜂 integrin β 蛋白序列结构示意图

Fig. 2　Schematic map of integrin β protein from *Macroentrus cingulum*

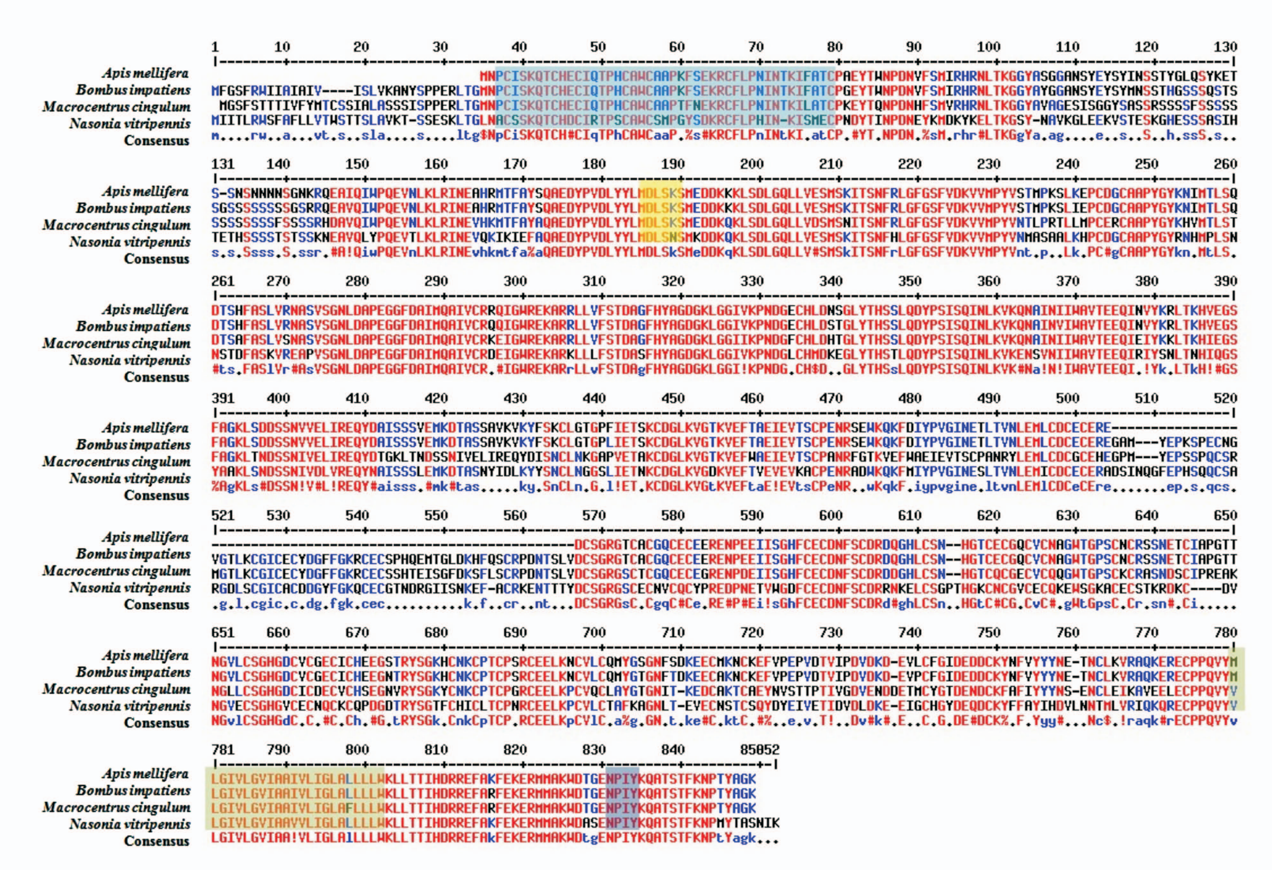


图 3　*Mcitg-β* 基因与其他昆虫整合素基因全长序列和其编码的氨基酸序列的多重比较

Fig. 3　Alignment of the complete nucleotide and deduced amino acid sequences of *Mcitg-β* with the integrin genes from other insects

信号肽用短虚线标示；浅蓝色部分为 PSI (plexin-semaphorin-integrin) 结构域；黄色部分为金属离子结合位点(metal ion-dependent adhesion site, MIDAS)序列；绿色部分为跨膜区；深蓝色部分为 NPIY 是胞内区重要的调控基序。The signal peptide is marked by dashed underline; the PSI domain is in light blue; The MIDAS sequence is in yellow; the putative transmembrane domain is in green; dark blue region represents NPIY motif which plays an important role in regulation the integrin β activation.

的胞外配体结构域，其与配体的结合受金属离子结合位点(metal ion-dependent adhesion site，MIDAS)的调节，其保守序列为 DXSXS (Colombatti *et al*., 1993)。PSI (plexin-semaphorin-integrin)结构域存在于整合素的 α 和 β 亚基的结构域中，主要调节整合素的激活时的构象改变。胞内胞质结构域则是一段较短的序列，可与细胞内的许多蛋白结合并参与信号传导，其中一段非常保守的 NPIY 序列在调节纺锤体定向和胞质分裂中起重要作用(Mould *et al*., 2005)。此外，整合素 β 结构域和整合素 β tail 结构域之间还有 3 个类 EGF 结构域。EGF 结构域主要维持蛋白的三维结构，对配体识别也有一定帮助作用(Shimaoka *et al*., 2002)。

将不同昆虫整合素 β 亚基氨基酸序列进行了比对可知(图3)，尽管不同昆虫整合素 β 亚基的序列均具有一定的差异，但却具有功能保守区，这些是整合素家族成员的特征。

2.2 *Mcitg-β* 的进化分析

使用 Mega 5.0 软件对氨基酸全长序列进行分析，并利用 Neighbor-joining 方法构建了不同昆虫整合素全长基因的系统发生树(图 4)。由系统发生树可以看出，不同昆虫的整合素基因相似性较高，聚为一类。其中，与腰带长体茧蜂整合素 β 基因同源性最近的是熊蜂整合素基因和西方蜜蜂整合素基因，明显地体现了进化的亲缘关系。

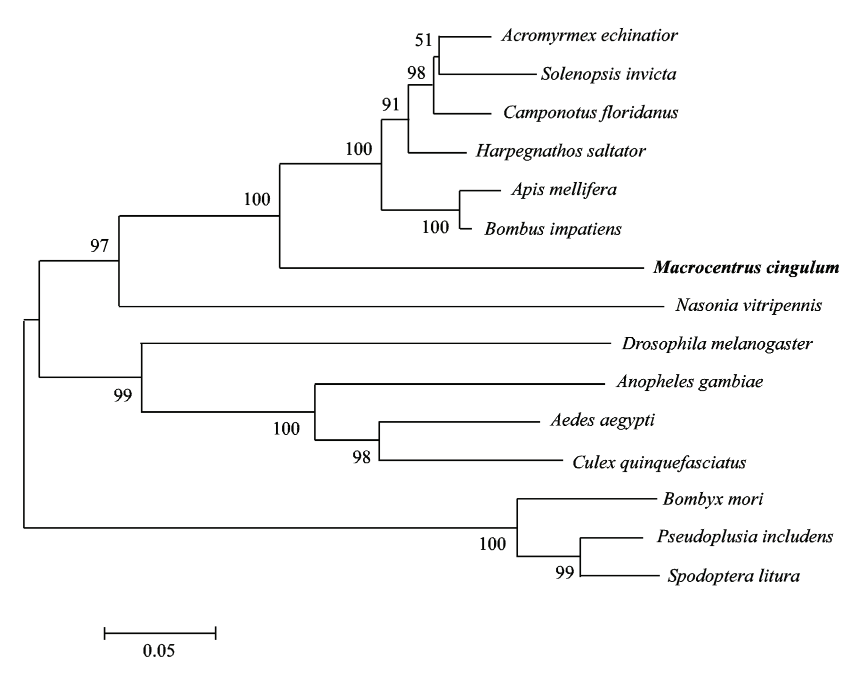


图 4 基于氨基酸序列的整合素基因系统发育分析

Fig. 4 An unrooted phylogenetic tree of integrin from different insects based on amino acid sequences

用于分析的蛋白的来源物种和 GenBank 登录号 The source species and GenBank accession numbers of the proteins included in the tree：西方蜜蜂 *Apis mellifera* (328784459)；丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* (345487183)；熊蜂 *Bombus impatiens* (350399337)；致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* (170040959)；埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (157132646)；冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (58381607)；弓背蚁 *Camponotus floridanus* (307184384)；印度跳蚁 *Harpegnathos saltator* (307214734)；切叶蚁 *Acromyrmex echinatior* (332020245)；红火蚁 *Solenopsis invicta* (322785595)；黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (24640486)；大豆夜蛾 *Pseudoplusia includens* (29650243)；家蚕 *Bombyx mori* (269959180)；斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (255760394). 使用 Mega 5.0 对氨基酸全长序列进行分析，构建系统发育树采用 Bootstrap 方法分析，每个分支进行 1 000 次验证，数值代表 Bootstrap 估算值。The phylogenetic tree was constructed using Mega 5.0 based on the amino acid sequence, each branch in 1 000 replications, and the numeral represents the estimated bootstrap value.

2.3 *Mcitg-β* 的表达

定量分析结果表明 *Mcitg-β* mRNA 在卵细胞中有较高表达，而在初级胚胎和二级胚胎中表达量相近，但与卵细胞相比相对较低(图 5)，而在二级桑葚胚时期则未有检测到 *Mcitg-β* mRNA 的表达。

2.4 体外浸泡法 RNA 干扰对腰带长体茧蜂胚胎增殖的影响

用浓度为 50 μg/mL dsRNA 或 siRNA 的培养基

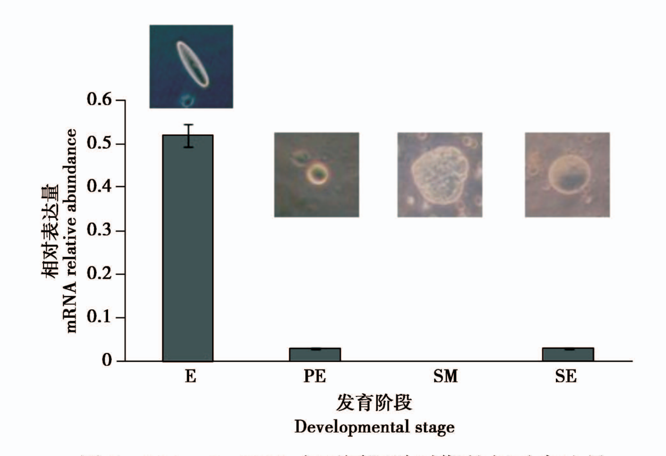


图 5　*Mcitg-β* mRNA 在不同胚胎时期的相对表达量

Fig. 5　The expression level of *Mcitg-β* mRNA in different embryonic stages of *Macrocentrus cingulum*

E：成熟卵细胞 Mature egg；PE：初级胚胎 Primary embryo；SM：二级桑葚胚 Secondary morula；SE：二级胚胎 Secondary embryo. 图中数据为平均值 ± 标准误（n = 3）。Data in the figure represent mean ± *SE*（n = 3）.

浸泡腰带长体茧蜂胚胎，以浸泡无 dsRNA 常规培养基为对照。利用定量 PCR 检测 *Mcitg-β* RNAi 后的基因表达情况，并统计移植后第 5 天的胚胎增殖率。

定量结果表明，ds*Mcitg-β* 或 si*Mcitg-β* 处理组胚胎的 *Mcitg-β* mRNA 表达相对于对照组明显受到了极显著抑制，两者的表达量均下降了约 45%（图 6），说明 ds*Mcitg-β* 和 si*Mcitg-β* 都能成功进入胚胎内部并发挥干扰作用。统计结果显示，移植后第 5 天，ds*GFP* 阳性对照组内胚胎的增殖数量与阴性对照组相仿。可知，浸泡 ds*GFP* 对胚胎的增殖能力影响不大。而浸泡 ds*Mcitg-β* 则导致胚胎增殖率出现明显的下降，该组胚胎数量仅为对照组的 45%（图 7）。以上结果说明，与腰带长体茧蜂体内功能基因没有明显关系的 ds*GFP* 对胚胎增殖没有明显的干扰效应，而能干扰 *Mcitg-β* 的 dsRNA 则能引起极显著的干扰效应。

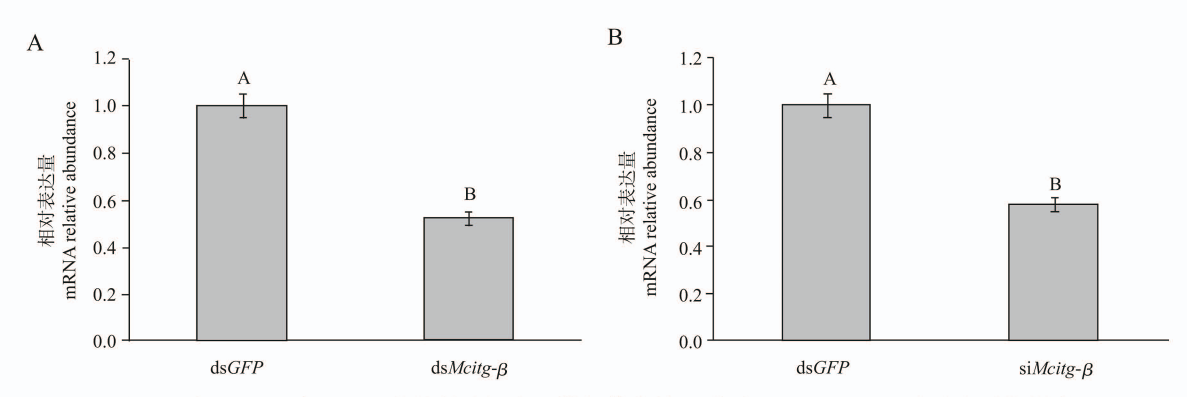


图 6　含 dsRNA 或 siRNA 的培养基浸泡腰带长体茧蜂胚胎对 *Mcitg-β* mRNA 表达水平的影响

Fig. 6　mRNA expressional level of *Mcitg-β* after soaking of *Macrocentrus cingulum* embryo in culture containing dsRNA or siRNA

A：50 μg/mL ds*Mcitg-β*；B：10 μg/mL si*Mcitg-β*. 对照组 ds*GFP* 和 si*GFP* 以及处理组 ds*Mcitg-β* 和 si*Mcitg-β* 的 mRNA 表达量均以 *rps* mRNA 的表达量作参照，对照组的表达量归为 1.0。图中数据为平均值 ± 标准误（n = 3），每次独立重复实验均统计每个时间点所有 RNAi 的有效数据数据(将 mRNA 水平下降 > 10% 的视为有效数据)；柱上不同字母表示统计分析表明处理组与对照组存在极显著差异(*t* 检验，$P < 0.01$)。Both mRNA levels of *Mcitg-β* and *GFP* were relative to the *rps* mRNA level. The mRNA expression level of the ds*GFP* or si*GFP* group is designated as one. Each point represents the mean ± *SE* from three independent experiments with all effective individuals for target gene detection, and an individual with more than a 10% of decrease of the target gene expression is regarded as an effective RNAi. Different letters above bars indicates extremely significant differences between the ds*Mcitg-β* or si*Mcitg-β* group and blank control group at the 0.01 level (*t* test).

2.5　寄主体内注射 ds*Mcitg-β* 对腰带长体茧蜂胚胎增殖的影响

向被寄生过的亚洲玉米螟注射 20 μg 的 ds*GFP* 或 ds*Mcitg-β*，以注射生理盐水为对照，出蜂后统计腰带长体茧蜂的成蜂数量。ds*Mcitg-β* 处理组亚洲玉米螟的出蜂数量与对照组相比显著降低，平均出蜂数量为 20 头，对照组为 25 头。此外，出蜂数量的分布情况也发生变化，对照组约有 60% 的寄主其出蜂数量集中在 21 ~ 30 头的区间，而处理组仅有约 25% 的寄主在此区间，其峰值出现在 11 ~ 20 头的区间。在 1 ~ 10 和 11 ~ 20 的出蜂数量区间，处理组所占比例大于对照组；而在 21 ~ 30，31 ~ 40 和 41 ~ 50 的出蜂数量区间内，处理组所占比例则小于对照组(图 8)。因此，可推断 ds*Mcitg-β* 处理后确实使出蜂数量出现了整体下降。

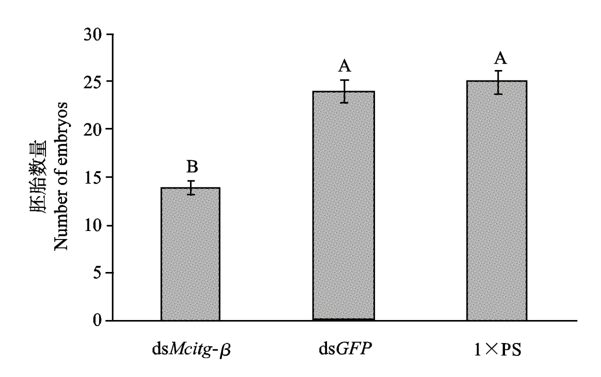


图 7 含 50 μg/mL ds*Mcitg-β* 的培养基浸泡处理对腰带长体茧蜂胚胎增殖的影响

Fig. 7 Effects of soaking of *Macrocentrus cingulum* embryo in culture containing 50 μg/mL ds*Mcitg-β* on the proliferation of embryo

PS: Pringle 氏昆虫生理盐水 Pringle's saline. 图中数据为平均值 ± 标准误(N = 3, n = 15); 柱上不同字母表示统计分析表明 ds*Mcitg-β* 处理组与对照组存在极显著差异(t 检验, $P < 0.01$)。Each point represents the mean ± *SE* from three independent experiments with three effective individuals. Different letters above bars indicate extremely significant differences between the ds*Mcitg-β* group and blank control group at the 0.01 level (t test).

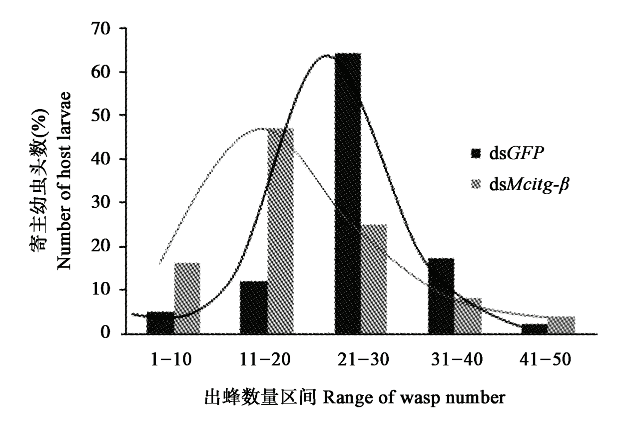


图 8 往亚洲玉米螟幼虫体内注射 20 μg/mL ds*GFP* 或 ds*Mcitg-β* 后腰带长体茧蜂出蜂的数量分布

Fig. 8 Distribution of the number of *Macrocentrus cingulum* wasps emerged after injection of 20 μg/mL ds*GFP* or ds*Mcitg-β* into the body of the host *Ostrinia furnacalis* larvae

3 讨论

腰带长体茧蜂是一种非常重要的天敌寄生蜂，主要寄生重要的农业害虫亚洲玉米螟，在大田中，对亚洲玉米螟的自然寄生率最高可达到 70% 以上(张安盛, 2003)。腰带长体茧蜂具有多胚发育的特性，它的一个卵可以分裂并增殖成几百至上千个胚胎，它们中的大部分不能完成发育，只在蜂幼虫期作为食物补充蜂幼虫的营养。因此，最后只有几十个胚胎可以发育成蜂。在这个过程中产生多少具有发育能力的二级胚胎细胞是决定后代数量的主要原因。获得更多的后代对寄生蜂的繁殖和应用是非常重要的，因此我们希望能够深入了解腰带长体茧蜂的胚胎增殖机制。整合素是重要的细胞粘连分子，主要参与细胞与细胞及细胞与基质之间的相互作用。整合素作为跨膜蛋白，就如同细胞膜上的一座桥梁，通过与细胞内外的蛋白相互作用介导了细胞由内向外和由外向内的信息传导过程(Arnaout *et al*., 2007)。整合素参与细胞内许多信号反应，从而调控了许多的生命活动，在细胞增殖过程中起的调控作用尤为重要。

qRT-PCR 检测结果表明，*Mcitg-β* 基因在茧蜂卵中大量表达，在初级胚胎细胞及二级胚胎细胞中有一定量表达，但在二级桑葚胚中检测不到 *Mcitg-β* mRNA 的表达，推断二级桑葚胚可能处于母型基因向合子型基因转变时期，此时母型基因减少但合子基因尚未表达(Schier, 2007)，导致未能检测到 *Mcitg-β* mRNA 的表达结果。虽然 *Mcitg-β* mRNA 在二级桑葚胚时期微量表达，但 Mcitg-β 蛋白在二级桑葚胚形成前可能已经由母体基因合成。由于寄生后第 2 天，腰带长体茧蜂的初级胚胎将会发育为二级桑葚胚，因此，RNAi 注射实验选取寄生后 30 h 作为干扰时间点。干扰所产生的效果会降低 Mcitg-β 蛋白的表达，从而达到影响胚胎增殖的目的。此外，本实验向每头亚洲玉米螟注射的 dsRNA 量达到 20 μg，使得在亚洲玉米螟血浆内的 dsRNA 初始浓度可达 500 μg/mL，从而延长 RNAi 的作用时长，使基因在胚胎中的沉默效应更为有效。

二级胚胎的大量增殖是多胚发育模式的一个主要表现。二级胚胎处于未分化的状态，具有干细胞的特性，在适宜条件下可发育为成蜂。干细胞维持未分化状态的自我更新和分化是通过细胞分裂实现的，它在体内环境中通常会形成极性，因此，细胞分裂的方向决定了子细胞的命运。人的神经前体细胞停留在一个极性环境中，不同的分裂方向产生了神经前体细胞、神经胶质细胞和神经元等不同类型的子细胞，其中纺锤体的定向对于干细胞的分裂方向有重要的决定作用(Knoblich, 2008; Siller and Doe, 2009)。整合素可以有效调节纺锤体的定向，从而进一步调控细胞的分裂方向(Toyoshima and Nishida, 2007)。例如，在果蝇卵巢细胞中，整合素通过与细胞外基质的成分结合来调控滤泡干细胞的

纺锤体平行于生殖干细胞，以维持滤泡细胞保持形成单层细胞(Fernández-Miñán *et al*., 2007；O'Reilly *et al*., 2008)。腰带长体茧蜂二级桑葚胚在刚进入分裂期时，胚内的胚胎细胞贴着胚外膜进行分裂，并产生极性。胚胎中的整合素基因 *Mcitg-β* 与胚外膜上的细胞外基质结合，调控胚胎细胞纺锤体的定向，决定了不同细胞分裂的方向，从而产生两种不同命运的子细胞——可正常发育为个体的全能性胚胎细胞和不能发育的非正常胚胎细胞（未发表数据）。RNAi 降低了 *Mcitg-β* 的表达，从而影响了 *Mcitg-β* 对胚胎细胞分裂调控功能，使它更多地产生不具有发育能力的子细胞，因此最终造成茧蜂出蜂数量的减少。另外，整合素亦与细胞凋亡有极大的关联（Giancotti and Ruoslahti, 1999; Streuli, 2009)，RNAi 不仅降低了 *Mcitg-β* 的表达量，同时也干扰了其与细胞外基质的结合，导致促进了胚胎细胞的凋亡，同样亦会造成腰带长体茧蜂出蜂数量减少的结果。

本文结果初步证明 Mcitg-β 可能会通过调控蜂胚胎的增殖数量影响最后的出蜂数量。胚胎细胞的增殖和分化是非常复杂的过程，可能有多个因子参与相关调控过程，更精确的结论还有待于更多的后续研究结果的支持。

参考文献（References）

Arnaout MA, Goodman S, Xiong JP, 2007. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol*., 19(5): 495-507.

Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D, 2010. Integrins. *Cell Tissue Res*., 339(1): 269-280.

Colombatti A, Bonaldo P, Doliana R, 1993. Type A modules: interacting domains found in several non-fibrillar collagens and in other extracellular matrix proteins. *Matrix*, 13(4): 297-306.

Fernández-Miñán A, Martín-Bermudo MD, González-Reyes A, 2007. Intgerin signaling regulates spindle orientation in *Drosophila* to preserve the follicular-epithelium monolayer. *Curr. Biol*., 17(8): 683-688.

Giancotti FG, Ruoslahti E, 1999. Intgerin signaling. *Science*, 285(5430): 1028-1032.

Giancotti FG, Tarone G, 2003. Positional control of cell fate through joint intgerin/receptor protein kinase signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*., 19: 173-206.

Goddeeris MM, Cook-Wiens E, Horton WJ, Wolf H, Stoltzfus JR, Borrusch M, Grotewiel MS, 2003. Delayed behavioural aging and altered mortality in *Drosophila* beta integrin mutants. *Aging Cell*, 2(5): 257-264.

Hu J, Zhao H, Yu X, Liu J, Wang P, Chen J, Xu Q, Zhang W, 2010. Integrin beta1 subunit from *Ostrinia furnacalis* hemocytes: molecular characterization, expression, and effects on the spreading of plasmatocytes. *J. Insect Physiol*., 56(12): 1846-1856.

Hynes RO, 2002. Intgerins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6): 673-687.

Knoblich JA, 2008. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*, 132(4): 583-597.

Levin DM, Breuer LN, Zhuang S, Anderson SA, Nardi JB, Kanost MR, 2005. A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 35(5): 369-380.

Loeb MJ, 2006. Role of integrin beta1-like protein in proliferation and differentiation of cultured stem cells from midgut of *Heliothis virescens*. *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 61(2): 55-64.

Mould AP, Travis MA, Barton SJ, Hamilton JA, Askari JA, Craig SE, Macdonald PR, Kammerer RA, Buckley PA, Humphries MJ, 2005. Evidence that monoclonal antibodies directed against the integrin beta subunit plexin/sema-phorin/integrin domain stimulate function by inducing receptor extension. *J. Biol. Chem*., 280(6): 4238-4246.

O'Reilly AM, Lee HH, Simon MA, 2008. Integrins control the positioning and proliferation of follicle stem cells in the *Drosophila* ovary. *J. Cell Biol*., 182(4): 801-815.

Schier AF, 2007. The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science*, 316(5823): 406-407.

Shimaoka M, Takagi J, Springer TA, 2002. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*., 31: 485-516.

Siller KH, Doe CQ, 2009. Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol*., 11(4): 365-374.

Streuli CH, 2009. Integrins and cell-fate determination. *J. Cell Sci*., 122(2): 171-177.

Toyoshima F, Nishida E, 2007. Spindle orientation in animal cell mitosis: roles of integrin in the control of spindle axis. *J. Cell Physiol*., 213(2): 407-411.

Xu Q, Yu X, Liu J, Zhao H, Wang P, Hu S, Chen J, Zhang W, Hu J, 2012. *Ostrinia furnacalis* integrin β1 may be involved in polymerization of actin to modulate spreading and encapsulation of plasmatocytes. *Dev. Comp. Immunol*., 37(3(4): 438-445.

Zhang AS, Feng JG, Yu Y, Zhang SC, 2003. Research progress of *Macrocentrus linearis*. *Natural Enemies of Insects*, 25(2): 89-92. [张安盛，冯建国，于毅，张思聪，2003. 螟虫长距茧蜂研究进展. 昆虫天敌，25(2): 89-92]

Zhou DR, Wang YY, Liu BL, Ju ZL, 1980. Studies on the mass rearing of corn borer. I. Development of a satisfactory artificial diet for larval growth. *Journal of Plant Protection*, 7: 113-122. [周大荣，王玉英，刘宝兰，剧正理，1980. 玉米螟的大量繁殖研究：I. 一种半人工饲料及其改进. 植物保护学报，7: 133-122]

（责任编辑：赵利辉）